穗花蛇菰抗炎鎮痛之藥理學研究

蔡輝彥 經精精 陳玉芳 謝文聰 吳天賞* 陳介甫**
中國醫藥學院 藥理學科暨中國藥學研究所 台中 台灣
*成功大學 化學系 台南 台灣 **國立中國醫藥研究所 台北 台灣

摘 要

穗花蛇菰(Balanophora spicata HAYATA)爲蛇菰科植物，臺灣民間一般用以清熱解毒、散瘀消腫、涼血止痛。本研究擬就穗花蛇菰的地上及地下部分，進行其鎮痛、消炎之探討。結果發現穗花蛇菰對醋酸扭體反應有抑制作用，而在福馬林舔足實驗中顯示地上、地下及各分層對面、後期舔足時間均有劑量依存性的抑制效果，而且後期抑制效果大於前期。再將各分層以柱層分離得到germacerene B, β-amyrin , β-amyrin palmitate, lupeol palmitate, lupeol acetate 和lupeol stearate 。其中lupeol sterate產率最高，並於formalin致炎實驗中，發現其對後期有顯著抑制作用；並可抑制醋酸的扭體反應。

穗花蛇菰之抗炎效果以足趾浮腫及皮膚視窗實驗分析，發現對λ-carrageenin 及serotonin引發之足趾腫脹有作用；對各種不同致炎劑(bradykinin, PGE2, histamine, serotonin等)引起之皮膚血管滲透性增加之也有明顯的抑制效果。

綜合以上結果，可知穗花蛇菰的確有很好的消腫止痛作用，其鎮痛機轉可能和中區及周邊神經系統有關。

關鍵詞：穗花蛇菰 民間藥 鎮痛和消炎作用

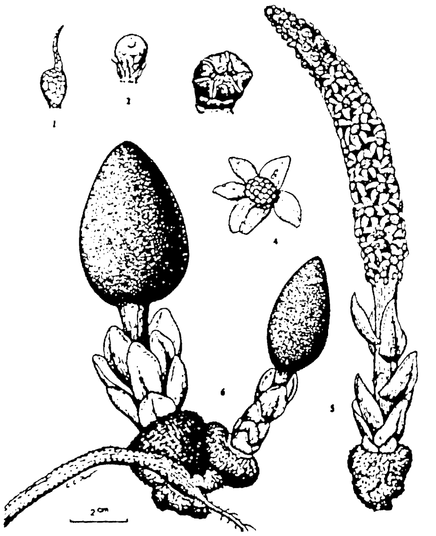
前 言

台灣位於熱帶及亞熱帶地區，高山聳立，溪谷縱橫，各種地形無不齊備。尤其因有充沛的雨量，遂孕育多種不同的生物，到處蘊藏著多種珍貴的動植物。早期醫藥不十分發達的時候，民間就常利用這些珍貴的資源，以治療各種疾病，也就是現今吾人所稱之民間藥。

蛇菰科(Balanophoraceae)植物之共同特徵及分佈1~3爲一年生或多年生之肉質草本植物，寄生於植物根上，色棕，紅或黃，無葉綠素和氣孔，葉退化成鱗片狀，互生，塊狀的根莖粗糙；成單一或分枝狀，花單性，很少兩性，雌雄同株或異株，密集成一個單性或兩性的花序，無花被或具3-8裂的花被；雄蕊在無花被中1-2枚，在有花被中常與花被裂片同數且與彼等對生；花藥2-4 室或多室，分離或合生，孔裂或縱裂；雌花小，無柄，密生在軸表面；花被無或很小；子房1-3室；花柱1-2枚，頂生，很少無花柱；而柱頭成盤狀，胚珠單生，常下垂；果小，成尖果狀；種子一粒，胚乳豐富。

全世界約有18屬，100種，主要分佈於熱帶及亞熱帶地區，從印度，馬來亞到澳洲，太平

洋諸島；均有之。台灣產蛇菰屬，約有三種。 1). 粗穗蛇菰 (Balanophora dioica R.Br.ex Royle)，全草有壯陽補腎、止血生肌的功能，用於神經官能症、陽萎、慢性肝炎、外傷出血、消化道出血、月經過多2~5 。2). 筆頭蛇菰 (Balanophora harland Hook. f.)，全草味酸微苦、辛，性涼解毒、散瘀、消腫、用於痔瘡、胃痛、咳血。外用調以麻油或酒，搗敷患處，用於跌打損傷、創瘍腫毒、頸淋巴結核2,3,6~8 。3). 穗花蛇菰 (Balanophora spicata Hayata)，全草有清熱解毒，醒酒、強精、壯陽之效。治肺熱咳嗽吐血，腸風下血，血崩，風熱斑疹，痔瘡腫痛，小兒陰莖腫，指生蛇頭疔9-12。植物的寫生圖如下：



1.雌蕊　2.雌蕊包圍著不孕的頂端　3.雄花芽　4.開放之雄花
5.花芽近尖端之雄株植物　6.雌株植物

圖：穗花蛇菰之寫生圖(A)（摘自臺灣植物誌）和原植物(B)

穗花蛇菰是台灣固有種的蛇菰科寄生植物，寄生於闊葉林根部。民間用於清熱解毒，散瘀消腫，涼血止痛，可治腸風下血，風熱斑疹，痔瘡腫痛等。然對其藥理作用之文獻幾無，且傳統中藥或民間襲用藥材仍有很大的發展空間，尤其在此科技化時代，實有必要以科學方法，客觀態度，進一步去探討其作用機轉。故本實驗擬將此植物分成地上及地下兩部分，就其粗抽液，及其各分層進行抗炎鎮痛之藥理學研究。

材料與方法

藥材之製備及其抽提與分離

一、藥材處理

採取新鮮藥材，分剪地上、地下部，經洗淨後以甲醇萃取得粗抽液，經過濾何併減壓濃縮得粗抽物加適量水；再以hexane，ethyl acetate，butanol 進行分配分離(如下圖)，經乾燥減重測得地上部各分層產率為 hexane層0.6%，ethyl acetate層8.5%，butanol層7.7%，water層7.0%，地下部各層產率為hexane層1.4%，ethyl acetate層0.3%，butanol層4.1%，water層6.9%。

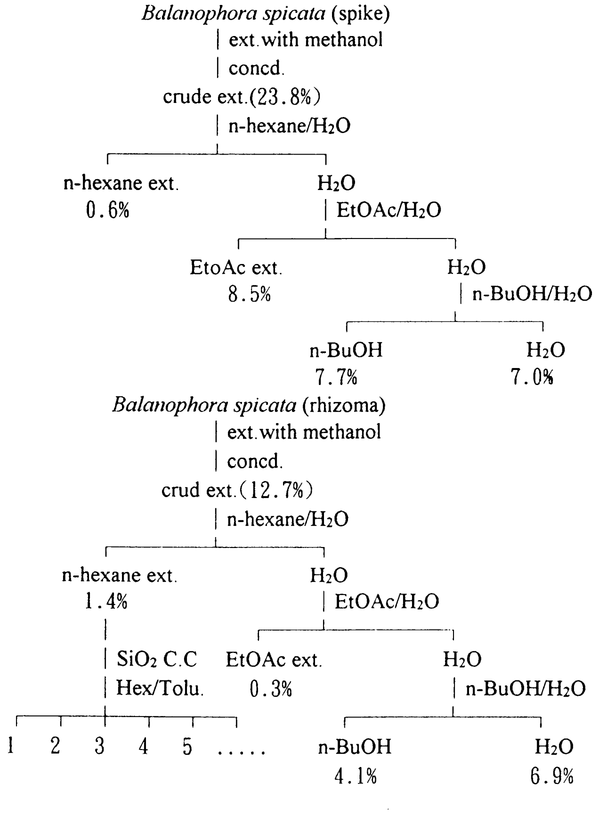


Fig. Extraction and separation of the constituents of Balanophora spicata

二、實驗方法

㈠急性毒性實驗

採Litchfield and Wilcoxon之方法13，使用體重18-25g ICR系雄性鼷鼠，穗花蛇菰地上或地下部粗抽物(以下簡稱BSS及BSR)經腹腔給藥後，連續觀察72小時，記錄其中毒及死亡情形，求得鼷鼠半數致死劑量及其95%之可信度。

㈡鎮痛實驗(formalin test)

1. 福馬林舔足實驗(formalin test)14

採用20-30g ICR雄性鼷鼠，隨機分組，每組8隻，稱重後以腹腔注射給與生理食鹽水及aspirin作對照，實驗組則腹腔給與各分層之穗花蛇菰，10，25，50，100，250 mg/kg，30分鐘後於鼷鼠右後足背皮下注射25 ul，1％formalin，觀其舔右後足所花時間，每五分紀錄一次結果，其中0-5分鐘稱前期(early phase)，15-40分稱後期(late phase)，觀察紀錄40分鐘，並統計之。

2. 醋酸扭體反應實驗(writhing response)15

採用20-30g ICR雄性鼷鼠，隨機分組，每組8隻，稱重後口服投與生理食鹽水，aspirin作對照，實驗組則口服投與穗花蛇菰各分層藥物，一小時後以0.1 ml/10 g之劑量，腹腔注射給與1％acetic acid溶液誘發扭體反應，5分後開始觀察紀錄因醋酸引起肌肉收縮並伴隨扭體反應(writhing response)次數10分鐘，並統計結果。

㈢抗炎實驗

1. 大鼠足蹠浮腫實驗16

選用150-240 g雄性Wistar系雄性大鼠，每組8隻，於右後足跟作記號，並測量給藥前之體積，而後腹腔給與穗花蛇菰地上，地下部50，100，250 mg/kg，0.1 ml/100g，對照組則以indomethacin 4 mg/kg，0.1 ml/100g給與，半小時後於右後足蹠後皮下注射致炎劑1% λ-carrageenin，誘發足蹠浮腫後，連續以plethysmometer 測其排水量，每30分測一次，連續五小時，比較生理食鹽水組及給藥組間之差異，其中浮腫率計算如下：

$$\text{浮腫率 (edema rate)} = \frac{B - A}{A} \times 100\ \%$$

A：注射前之排水量

B：第n次後之排水量

2. 大鼠皮膚視窗實驗17

採用150-240 g雄性Wistar系雄性大鼠依Otani及Hugli皮膚視窗實驗經修飾之法，腹腔分別投與地上與地下部50，100，250 mg/kg的劑量，30分鐘後以pentobarbital 30 mg/kg麻醉，再以剃毛機剃除腹部皮毛，以印泥在腹部中線兩旁標示六部位(圓的直徑爲2cm)，由大白鼠陰莖靜脈注射50 mg/kg Evan's blue，二分鐘後分別由皮內注射發炎劑bradykinin (10 nM)，histamine (10 -5M)，PAF (40nM)，PGE2 (2nM)，serotonin (1nM)，及生理食鹽水50 μ 1，1小時後頸椎拉斷犧牲，剪下各分區約20mm皮膚，以剪刀剪碎，剪碎之滲藍皮膚置於3 ml，0.5 %硫酸鈉及7 ml丙酮中隔夜萃取24小時後再以2000 g速度離心20分鐘，取出上清液，而後在620 nm波長下測吸光。

三、實驗試藥

*1.*下列藥品購自(Darmstadt，F. R. Germany)

n-hexane,Aacetone, ethyl acetate, n-butanol, methanol, formalin, acetic acid, chloroform, toluene, sulfuric acid.

*2.*下列藥品購自(St. Luis, Mo, USA)

carrageenin, serotonin, bradykinin, platelet activating factor, Evan's blue, aspirin, indomethacin, histamine.

四、實驗結果之統計分析

本研究結果之數據以unpaired student's t-test方法統計，以分析其間差異之顯著性，凡P值小於0.05時，則認爲其異差具有統計意義。

實驗結果

一、急性毒性實驗

由腹腔給予穗花蛇菰地上及地下抽出物(簡稱BSS，BSR)作鼷鼠急性毒性實驗，其半數致死劑量分別爲320 mg/kg及1350 mg/kg(表 1)。

表 1 穗花蛇菰之急性毒性試驗 (mg/kg)

	BSS	BSR
LD_{50}	320	1350
95% confidence interval	277.33-369.24	1154.64-1578.42

二、鎮痛實驗

1.福馬林舔足實驗

穗花蛇菰地上及地下部粗抽物經腹腔分別給與ICR雄性鼷鼠10，25，50，100，250 mg/kg五個劑量，在indomethacin 40 mg/kg對照下，地上部對於福馬林誘發舔足的前期反應時間，自25 mg/kg到250 mg/kg呈現劑量依存性的抑制作用，而後期舔足總反應時間則自50 mg/kg至250 mg/kg才有統計上的異差(Fig. 1)；其地下部粗抽物對前期反應時間自10 mg/kg到250 mg/kg也呈現抑制作用，後期舔足時間則自25 mg/kg始呈現明顯抑制作用(Fig. 2)。

經上述實驗結果得知，穗花蛇菰地上及地下粗抽物對福馬林誘發舔足的前後期反應時間均有明顯縮短現象，故進一步將其地上及地下部分層，而予以探討；相同地，在以福馬林誘發舔足之前30分，分別以腹腔注射地上及地下部10，25，50 mg/kg三個劑量，結果顯示對前後期舔足時間

均有抑制作用，其中尤以hexane層最爲明顯(Fig. 3; Fig. 4)。爲進一步探討hexane層鎮痛機轉，將此層做成分抽提，而得產率最高成分lupeol acetate，進行福馬林舔足實驗，發現其對前期舔足時間無抑制作用(Fig. 5-A)，而後期在10，25，50 mg/kg三個劑量投與下，則有明顯的異差(Fig. 5-B)。

2.醋酸扭體反應實驗

穗花蛇菰地上及地下部粗抽物，腹腔投與雄性鼷鼠10，25，50 mg/kg，以1% 醋酸誘發扭體反應，結果均呈現明顯的抑制作用(Fig.6; Fig. 7)。地上部水層及乙酸乙酯層則在50 mg/kg才有效果，正丁醇層及 hexane 層則有劑量依存性的抑制效果，其中又以hexane層抑制作用最爲明顯(Fig. 8)；而地下部則以乙酸乙酯層及hexane層有明顯作用(Fig. 9)。進一步以hexane層抽提之成分lupeol acetate作醋酸扭體實驗，50 mg/kg以上劑量具明顯抑制效果(Fig. 10)。

三、抗炎實驗

1.大鼠足蹠浮腫實驗

採用體重150-240 g雄性Wistar系大鼠，依Winter等人(1962)修飾後之法，先測給藥前足蹠體積，再以腹腔注射穗花蛇菰地上，地下部粗抽物，各層抽出物及indomethacin，30分後分別以0.1 ml的1% λ-carrageenin的0.1% formalin，或1% serotonin注入大鼠足蹠誘發浮腫，經30分後以體積變動記錄儀測得浮腫體積，連續測5小時後結果顯示地上部及地下部均在1小時就有抑制浮腫效果；而地下部對formalin所誘發的浮腫無效(Fig. 11; Fig. 12)，各層劑量在100 mg/kg投與下，對λ-carrageenin誘發之足蹠浮腫有顯著抗炎效果，其中尤以hexane層效果最爲明顯(Fig. 13; Fig. 14)。

*2.*大鼠皮膚視窗實驗

採用150-240 g雄性Wistar系大鼠，依Otani及Hugli皮膚視窗實驗經修飾之法，腹腔投與地上及地下部粗抽物，結果發現對致炎物bradykinin，及PGE2皮膚血管滲透性增加作用，地上及地下部均在100 mg/kg及250 mg/kg有抑制效果；對histamine及serotonine則在50，100，250 mg/kg有劑量依存性之抑制作用；對PAF所造成皮膚血管滲透性亢進作用，地上部有效而地下部沒有顯著異差(Fig. 15)。

討　論

疼痛是一種複雜的生理、心理反應，不管是熱、電、機械或化學刺激引起都會造成痛感，是非常惱人的，許多祛瘀止痛藥均具有不同程度的鎮痛作用，今以穗花蛇菰此素材作鎮痛、抗炎的研究希望明瞭其成分的主要作用，或可對此民間藥有更進一步的認識。

若以化學物質刺激動物，如：acetic acid，bradykinin，K+，等腹腔注射刺激腹膜或接觸皮膚引起刺激化學敏感型接受體引發疼痛反應，表現腹部收縮內陷，後肢伸展，身體扭曲或蠕行等扭體表現15，18，19，當於腹腔注射1 %醋酸溶液前30分給與穗花蛇菰地上及地下部均呈現抑制扭體反應，而各層粗抽物也有不同程度抑制效果，其中尤以hexane層抽提，得到lupeol acetate；β-amyrin；β-amyrin palmitate及lupeol palmitate，以產率最高之成分lupeol acetate作扭體反應，發現在10 mg/kg低劑量下無作用，而在25及50 mg/kg劑量下有抑制效果，然而，大部分鎮痛藥對醋酸所誘發之扭體反應均有抑制作用，我們無法鑑別其作用是屬神經性痛覺抑制或阻斷周邊致痛物質引起，故進一步以福馬林舔足實驗分析之。

皮下注射稀釋過之福馬林於大鼠、貓14、鼷鼠20，21或靈長類動物22可觀察到兩相痛反應，此福馬林舔足實驗最早是由Dubuisson和Dennis 1977年提出，其對許多類鎮痛藥物的篩選是一有效且可靠的模型，當由皮下注入福馬林於人類皮膚，4-5分鐘時會引起強烈且尖銳的灼熱感，接下來30-60分則有持續的疼痛感，若表現於鼷鼠則因足掌受到注入的formalin刺激引起疼痛而有舔足或頓足的行爲表現23，最初注入的formalin於0-5分造成的痛反應(initial pain)所花費的舔足時間稱之爲前期(early phase)主要是因直接刺激痛覺接受體造成substance P，bradykinin釋出而有痛反應；而於13-30分所花費的舔足時間則稱之爲後期，主要是因發炎反應造成一些化學傳遞物(chemical mediators)，histamine、serotonin、prostaglandin及kinin，由受損組織細胞釋放出引起24。Formalin在所有集合的神經元(convergent neurons)會產生不同的雙向興奮反應，一是注射福馬林0-10分鐘，神經產生放電(mean maximum 22 spikes/sec)；一是於注射福馬林後20-65分，持續延長興奮反應(mean maximum 12 spikes/sec) 25。簡言之，以福馬林誘發小白鼠造成疼痛而有舔腳的行爲反應，可對發炎性及非發炎性疼痛的鎮痛藥物活性及作用機理作一有效的評估26。另外，以福馬林誘導產生的痛反應，其濃度大小佔很重要因素，當於0.02-0.2 %時僅誘導出前期舔腳反應，以光學顯微鏡作組織鑑定，其改變微小；而於1 %或更高之福馬林濃度時可誘導出前期及後期舔腳反應，若注入福馬林5 %，30分後在組織鑑定上可發現有急性發炎反應，顆粒球破壞及腫脹均可見27。故今乃以1 %福馬林誘導出兩相痛反應，結果發現穗花蛇菰地上(BSS)及地下部

(BSR)，對福馬林誘發的前後期舔足時間均有作用，尤對後期舔足反應時間作用較強；而地上、地下部各層粗抽物也有類似效果，尤以hexane層效果較爲明顯。故進一步對hexane層作成分之抽提，得到產率極高的lupeol acetate，取之作福馬林實驗，發現其對前期無抑制作用，對後期則有劑量依存性的抑制作用，故我們似可推測hexane層明顯的後期抑制作用可能來自於lupeol acetate，至於是否其它成分亦參與作用則有待進一步的分析。

早在幾千年前就已有人嘗試研究發炎反應：Celsiusin 30 A.D)描述四種爲人知的發炎徵兆：紅、腫、熱、痛28。其實，炎症乃是身體對傷害所採取的防禦措施，主要病徵是血管擴張，血流量增加造成充血現象而發紅；水分漏入組織引起水腫；血管擴張又血流量增加就有熱感，而腫脹的壓迫或體內kinin，或其它相關物質對神經末稍作用就引發疼痛，故炎症外表可見紅、腫現象，而炎症區血流量增加，致水分、電解質或血漿內蛋白質滲入到組織內等，都是血管性反應的表現。

用於評估抗炎藥之許多篩選方法中，常以注射大鼠致炎劑後能產生抑制浮腫之能力爲先決條件，最常使用之致炎物，包括鹿角菜膠(carrageenin)、酵母(yeast)、福馬林(formalin)、右旋醣甘(dextrose)及蛋白(albumin)16。1962年Winter等人，Risleyand Nuss先使用0.05 ml，1 %的λ-carrageenin 注射大鼠足趾，結果引發足趾腫脹，並於注射後連續量得3小時後浮腫體積；1963 年以此分析indomethacin之抗炎作用，遂成爲一種普遍研究抗炎活性之實驗；之後，1964年Niemegeers. 等人支持此實驗模式，用其作臨床抗風濕活性藥物之事先篩選；與其它誘發水腫之致炎劑相較，其優點是在發炎過程中爲局部刺激引起和抗原反應無關，且在毒性劑量下反應性佳，無全身性作用，再現性高16，29。事實上，carrageenin注入足趾所引起之浮腫是雙相性反應30，注射λ-carrageenin後，在不同時間有不同物質釋放而引起發炎即0-1.5小時或20分至1小時內(first phase)histamine，serotonin，PAF (platelet activating factor)會游離出來；1.5-2.5小時(second phase)，kinin類物質會釋放；2.5小時之後(third phase)，prostaglandin及leukotriens 31會放出。今以穗花蛇菰地上、地下粗抽物腹腔投與大鼠後，可見均有劑量依存性之抑制效果，而以地上部抑制炎症反應較地下部爲佳(Fig. 16,17)，此可能和地上部粗抽物效力較地下部爲強有關；在各層的炎症反應結果中可明顯看出hexane層效果較water層，butanol層，ethyl acetate 層都強。而以hexane層抽出之成分lupeol acetate作此浮腫實驗可見其效果是四層中作用最顯著的；lupeol acetate在夾竹桃科羅布麻(Apocynum venetum Linn.) 葉32；蘿藦科植物地梢瓜33(Cynanchum thesioides)；鵝絨籐(Cynanchum chinese R.Br.)34中均可發現，蘿布麻葉已有藥煙、茶、沖劑可使食慾增加,感冒減少；地稍瓜在民間用以治療體虛、乳汁不下、神經衰弱、氣血虧損、咽喉腫痛；鵝絨藤之莖乳汁塗擦可去疣贅、根祛風解毒、健胃止痛，另外，lupeol在豆科的廣金錢草(Desmodium styracifolium Merr.)35蔓性千金拔(Femingia philippinensis Li)36及爵床科的馬藍(Strobilanthes cusia O.Ktze.) 37也可發現，其中廣金錢草之汁葉入藥，可治療尿路感染、泌尿系結石、膽囊結石等症；蔓性千金拔之根有舒筋活絡、強筋壯骨等功效，民間用以治療跌打損傷、慢性腎炎等；馬藍有瀉火、解毒、涼血等功效，常用於流行性腮腺炎，流行性乙型腦炎、肝炎等疾病，近代藥理學研究更顯示美國灌木(Mimosa tenuiflora (Willd) Poiret可對抗一些寄生菌活性達一星期之久，在地方上用以治療燒傷、預防發炎，其鎮痛作用可持續

維持2-3小時並在幾個星期中使皮膚重整，用粉末製劑可明顯使嚴重灼傷者死亡率下降38，Pera benensis在南美，特別在玻利維亞用作地方性皮膚萊什蔓病(cutaneous leishmaniasis)之有效治療，二者成分均含有lupeol，觀察lupeol acetate爲五環三帖類化合物，而三帖類在自然界分佈很廣，一些中草藥如人參、桔梗、甘草、遠志、茯苓、柴胡多爲含有特殊生物活性的三帖皂甘或游離的三帖類化合物，多具有抗炎、利溼作用，是否lupeol acetate之抗炎作用和其結構關係密切，則有待進一步證明。

利用皮膚視窗實驗來評估抗炎藥對血管滲透性之影響，可利用不同致炎劑，引起局部炎症反應，引起血管滲透性增加，然後靜脈給與特殊染料，則當血管滲透性亢進時，根據此染料通透量反映炎症部位著色之深淺，來判定發炎之程度大小。而抗炎藥一般可以降低此毛細血管通透性，使用Evan's blue染料作爲血漿蛋白滲出之指標是基於其對血漿蛋白(Plasma albumin)有很強之親和力39，給與不同致炎劑bradykinin，histamine，PAF (Platelet activing factor)，PGE2(prostaglandin PGE2)後，結果穗花蛇菰地上部和地下部相較，其對不同致炎劑抑制效果來得強，因發炎時血管滲透性增加可因時間快慢，不同物質引起，如急性相(acute phase)乃因histamine造成，而延遲相(delayed phase) 則和血漿內kinins及組織內prostaglandin，leukotrienes等類物質有關40。今由實驗結果顯示，地上部粗抽物對發炎過程中釋放之媒介物均有不同程度抑制效果，可見其在發炎過程中各項媒介物均參與其中；地下部則對histamine，bradykinin，PGE2，serotonin，有作用，histamine，bradykinin，PGE2，serotonin等有很強血管通透作用；且bradykinin和substance P之游離有關41。又於鎮痛實驗中地上及地下均有抑制痛覺反應產生，故其造成發炎及疼痛之反應，可能和substance P有關，至於其詳細的藥理作用機轉，則還待深入探討。

參考資料

1. 黃增泉。1993。：植物分學,臺灣維管束植物科誌：國立編譯館主編。pp129-130。

2. 江蘇省植物研究所。1991。中國醫學科學院藥物研究所，中國科學院昆明植物研究所：新華本草網要（第二册），上海科學技術出版社。45，p46。

3. 臺灣植物誌編輯委員。1976。臺灣植物誌，現代關係出版社。2：p254-255。

4. Hayata b.。1906。東京帝國大學紀要（第22册），東京大學印行，p358-351。

5. 甘偉松。1980。中國高等植物圖誌，宏業書局印行，p550。

6. 全國中草藥編寫組編：全國中草藥匯編（下册），人民衛生出版社1983：p786。

7. 中國科學院西北植物研究所。1974。秦岭植物志，第一卷種子植物（第二册），科學出版社，p132-133。

8. 陳存仁。1975。中國藥學大辭典（下），旋風出版社印行，p1484。

9. 邱年永，張光雄。1986。原色臺灣藥用植物圖鑑(2)，中國醫藥學院，中國藥學研究所。1986：p35。

10. Hayata B. 1915. Icones plantarum formosanarum. The university Tokyo, Japan, 5-6：198.

11. Hayata B. 1908. Flora Montana Formosae. The university Tokyo, Japan. 25：p192.

12. Hayata B. 1908. Flora Montana Formosae. The university Tokyo, Japan. 25：p918.

13. Litchfield, J.T. and F.A. Wilcoxon. 1949. Simplifies method of evaluatig dose effect experiments. J.Pharmacol. Exp. Ther. 96：99-113.

14. Dubuisson, D. and S.G. Dennis. 1977. The formalin test：aquantitative of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulatuon in rats and cats. Pain 4：161-174.

15. Taber, R.I., D.D. Greenhouse, J.K. Rendell and S. Irwin. 1969. Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic - induced abdominal stretching in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 169：29-37.

16. Winter, C.A., E.A. Risler and G.W. Nuss 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Antiinflammatory Assay. 544-547.

17. Otani, A. and T.E. Hugli. 1962. Leukocyte chemotaxis：a new in vivo testing technique. Inflammatory. 544-547.

18. Allen, F.H., E.D. Brown, D. Rogers and J.K. Sutherland. 1967. Structure and reactivity in medium-ring olefins. Chem. Comm. 1116-1118.

19. Morikawa, K. and Y. Hirose. 1969. Germacrene-C, precursor of δ-elemene. Tetrahedron Letters. 22：1799-1801.

20. Nishimura, K. 1969. A new sesquiterpene; bicyclogermacrene. Tetrahedron Letters. 36：3097-3100.

21. Collier, H.O.J., L.C. Dinneen, C.A. Johnson and C. Sohneider. 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drug in the mouse. Br.J. Pharmacol. Chemother. 32：295-310.

22. Berkenkopf, J.W. and B.M. Weichman B.M. 1988. Production of prostacyclin in mice following intropiutional injection of acetic acid, phenylbenzoquinone zymosan：its role in the writhing response. Prostaglandins 36：693-709.

23. Wheeler, A.H., F. Porreca and A. Cowan. 1990. The rat paw formalin test : comparision of noxious agents. Pain 40 : 229-238.

24. Hunskaar, S., O.G. Berge and K. Hole. 1986. Dissociation between antinociceptine and anti inflammatory effects acetyl salicylic acid and indomethacin in the formalin test. Pain 25 : 125-132.

25. Alreja, M., P.Mutalik, U.Nayar and S.K. Manchanda. 1986. The formalin test : a tonic pain model in the primate. Pain 25 : 125-132.

26. Steinar, H. and H. Kjell. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluatiog mild analgesics. J. Neurossci. Methods. 14 : 69-76.

27. Shibata, M., T. Ohkubo, H. Takahashi and R. Inoki. 1989. Modified formalin test : characteristic biphasic pain response. Pain 38 : 347-352.

28. Dickenson, A.H. and A.F. Sullivan. 1987. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat : differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. Pain 30 : 349-360.

29. Hunskaar, S. and K. Hole. 1987. The formalin test in mice : dissociation between inflammatory and non-inflammatory. Pain 30 : 103-114.

30. Rosland, J.H., A. Tjolsen, B. Mahle and K. Hole. 1990. The formalin test in mice : effect of formalin concentraction. Pain 235-242.

31. Chen, M. and F. Lin. 1991. Sedative chemical constituents of leaves of Apocynum venetum Linn. China J. of Chinese Materia Medica. 16(10) : 609-611.

32. Yuan, H.Q. and C.X. Zuo. 1992. Studies on the chemical constituents of Cynanchum thesioides. Acta Pharm. Sinica. 27(80) : 589-594.

33. Wu, Y.D., F.Q. Zhang, M. Zhang, Q.S. Yan, B.S. Hunag and Z.L. Chen. 1991. Isolation and Identification of cyanester A From Cunanchum chinese R. Br. Acta Pharm. Sinica. 26 (12) : 918-922.

34. Massino, R. 1972. Biological properties of carrageenin. J. Pharm. Pharmacol. 24 : 89-102.

35. Vinegar, R., W, Schreiber and R. Hugo. 1969. Biphasic development of carrageenin edema in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 166(1) : 96-166.

36. Holsapple, M.P. and G.K.W. Yim. 1984. Therapeutic reduction of ongoing carrageenin induced inflammation by lipo-oxygenase, but cyclo-oxygenase inhibitors, Inflammation

8：233.

37.楊峻山，蘇亞倫，王玉美。1993。廣金錢草化學成分的研究，藥學學報28(3)：197-201。

38.李玲，廖時萱等。1993。馬藍的化學成分研究，藥學學報28(3)：238-240。

39. Anton, R., Y. Jing B. Weniger, J.P. Beck and L. Rivier. 1993. Pharmacognosy of Mimosa tenuiflora (Willd) Poiret. J. Ethnopharmacol. 38：153-157.

40. Fournet, A., A. Angelo, V. Munoz, F Roblot, R. Hocquemiller and Cave A. 1992. Biological and chemical studies of Pera benensis, a Bolivian plant used in folk medicine as a treament of cutaneous leishmaniasis. J. Ethnopharmacol. 37：159-164.

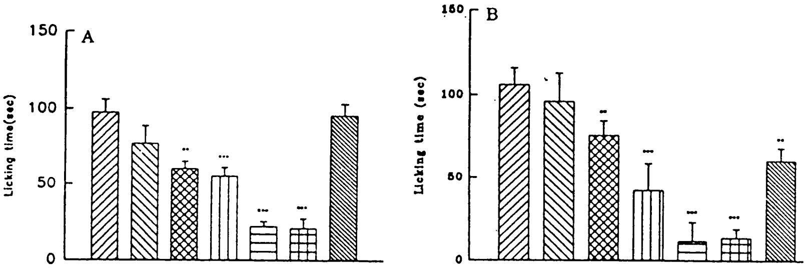


Fig.1 The effects of spike extract of *Balanophora spicata* (BSS) administered intraperitoneally on the early (A) and late phases (B) in formalin test in mice.

Control BSS 10 mg/kg BSS 25mg/kg BSS 50mg/kg BSS 100 mg/kg BSS 250mg/kg Indomethacin 40mg/kg

Data are shown as mean ± S.E. (n=10)

** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

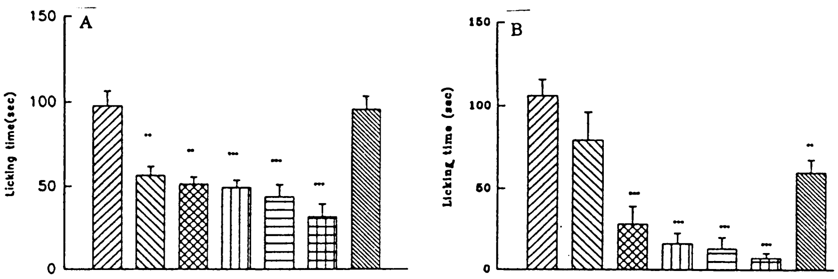


Fig. 2 The effects of rhizoma extract of *Balanophora spicata* (BSS) administered intraperitoneally on the early (A) and late phases (B) in formalin test in mice.

Control BSR 10mg/kg BSR 25mg/kg BSR 50mg/kg BSR 100mg/kg BSR 250mg/kg Indomethacin 40mg/kg

Data are shown as mean ± S.E (n=10).

** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

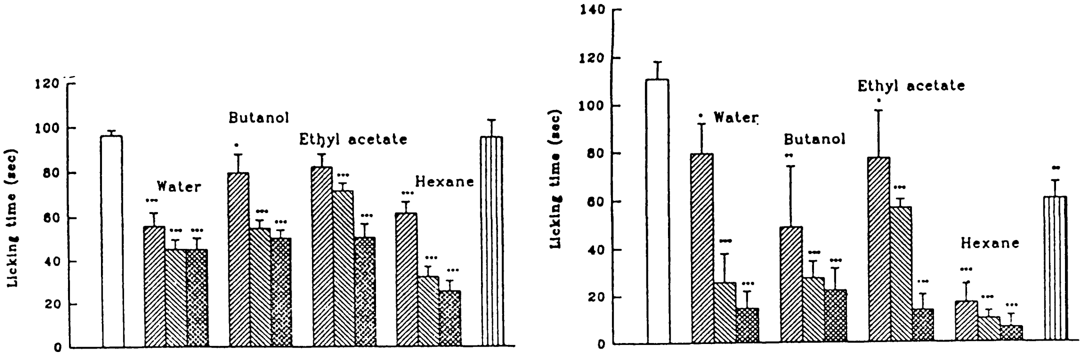


Fig. 3 The effects of different extracted layers from spike of *Balanophora spicata* (BSS) administered intraperitoneally on the early (A) and late phases (B) in formalin test in mice.

Control 10mg/kg 25mg/kg 50mg/kg

Indomethacin 40mg/kg

Data are shown as mean ± S.E. (n=8)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (compared with control)

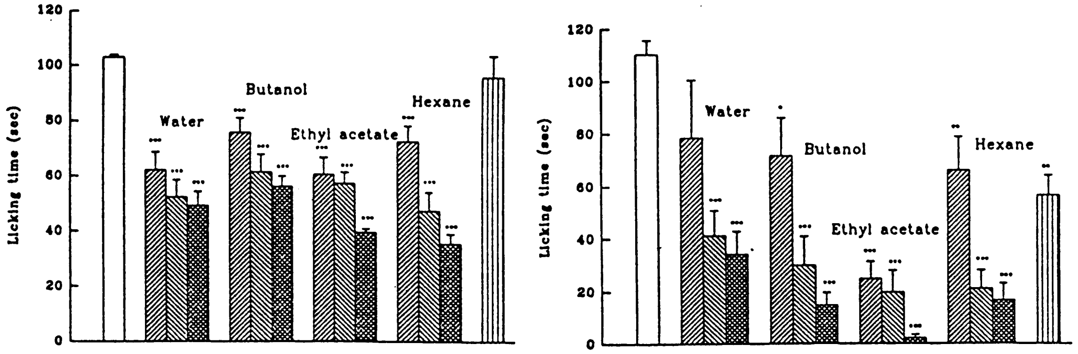


Fig. 4 The effects of different extracted layers from rhizoma of *Balanophora spicata spicata* (BSR) administered intraperitoneally on the early (A) and late phases (B) in formalin test in mice.

Control 10mg/kg 25mg/kg 50mg/kg

Indomethacin 40mg/kg

Data are shown as mean ± S.E. (n=8)

* $P<0.05$, *** $P<0.001$.(compared with control)

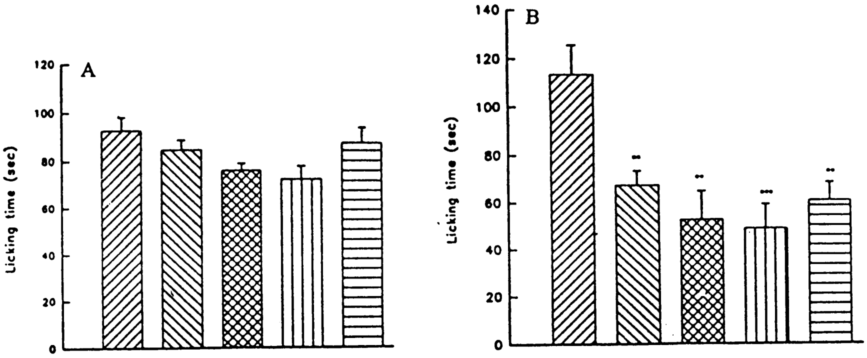


Fig. 5 The effects of lupeol acetate extracted from *Balanophora spicata* administered intraperitoneally on the early (A) and late phases (B) in formalin test in mice.

Control lupeol acetate 10mg/kg Lupeol acetate 25mg/kg
Lupeol acetate 50mg/kg Indomethacin 40mg/kg
Data are shown as mean ± S.E. (n=10)
** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

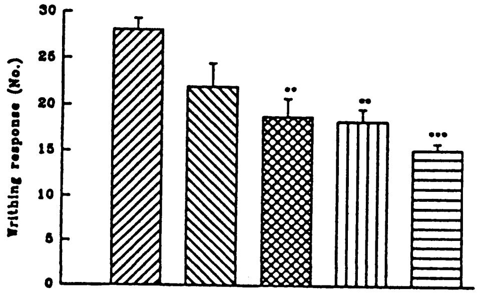


Fig. 6 The effects of spike extract of *Balanophora spicata* (BSS) administered intraperitoneally on acetic acid-induced writhing response in mice.

Control BSS 10mg/kg BSS 25mg/kg BSS 50mg/kg Aspirin 150mg/kg
Data are shown as mean ± S.E. (n=6)
** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

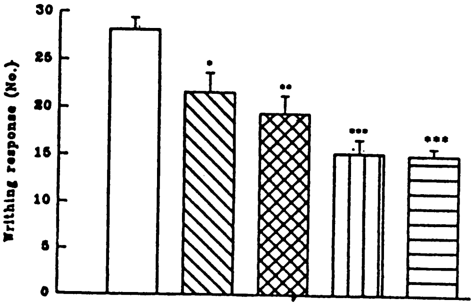


Fig. 7 The effects of rhizoma extract of *Balanophora spicata* (BSR) administered intraperitoneally on acetic acid-induced writhing response in mice.

Control BSR 10mg/kg BSR 25mg/kg BSR 50mg/kg Aspirin 150mg/kg
Data are shown as mean ± S.E .(n=6)
** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

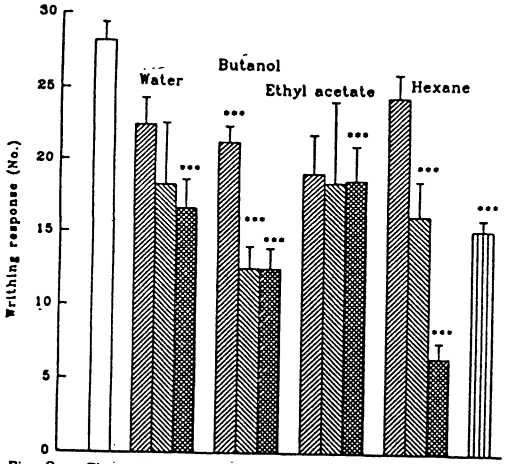


Fig 8 . The effects of different extracted layers from spike of *Balanophora spicata* on acetic acid-induced writhing response in mice
Control 10mg/kg 25mg/kg 50mg/kg Indomethacin 40mg/kg
Data are shown as mean ± S.E. (n=6)
* P<0.05, *** P<0.001 (compared with control)

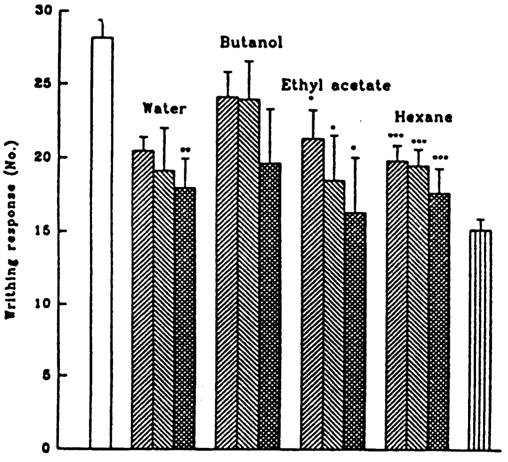


Fig 9 The effects of different extracted layers from rhizoma of *Balanophora spicata* on acetic acid-induced writhing response in mice
Control 10mg/kg 25mg/kg 50mg/kg Indomethacin 40mg/kg
Data are shown as mean ± S.E. (n=6)
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

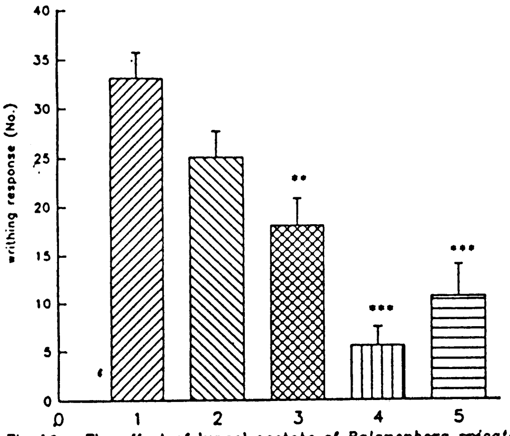


Fig 10 The effect of lupeol acetate of *Balanophora spicata* on acetic acid-induced writhing response in mice

Control; Lupeol acetate 10mg/kg; Lupeol acetate 25mg/kg; Lupeol acetate 50mg/kg; Aspirin 150mg/kg

Data are shown as mean ± S.E. (n=8)

** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)

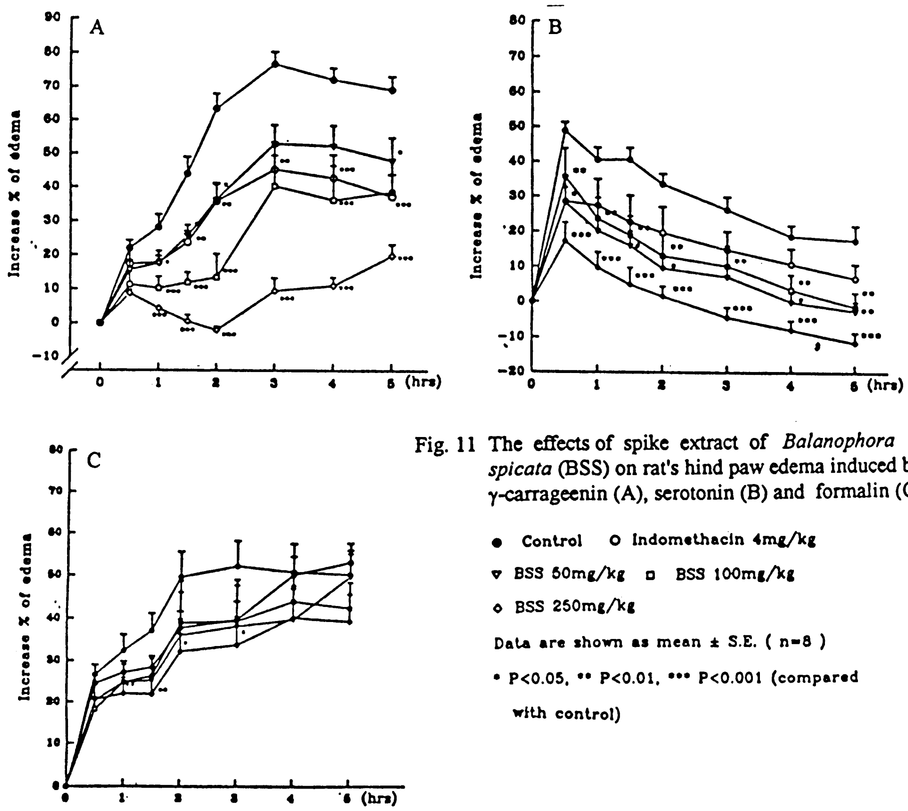


Fig. 11 The effects of spike extract of *Balanophora spicata* (BSS) on rat's hind paw edema induced by γ-carrageenin (A), serotonin (B) and formalin (C).

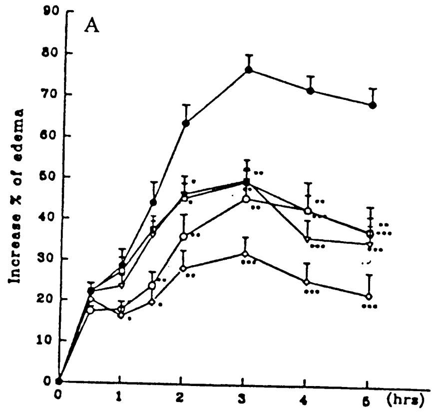
● Control ○ Indomethacin 4mg/kg

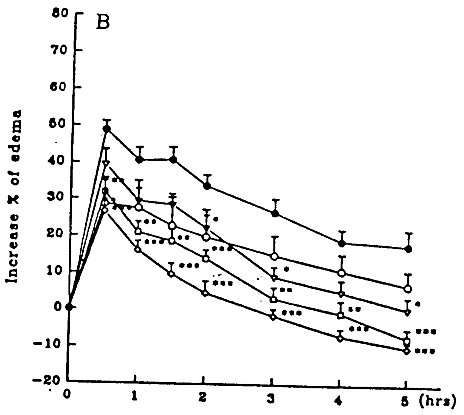
▽ BSS 50mg/kg □ BSS 100mg/kg

◇ BSS 250mg/kg

Data are shown as mean ± S.E. (n=8)

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (compared with control)





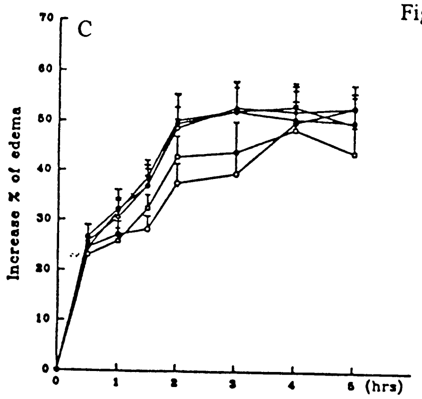


Fig. 12 The effects of rhizoma extract of *Balanophora spicata* (BSR) on rat's hind paw edema induced by γ-carrageenin (A), serotonin (B) and formalin (C).

● Control ○ Indomethacin ▽ BSR 50mg/kg

□ BSR 100mg/kg ◇ BSR 250mg/kg

Data are shown as mean ± S.E. (n=8)

* P<0.05, ** P<0.001, *** P<0.001 (compared with control)

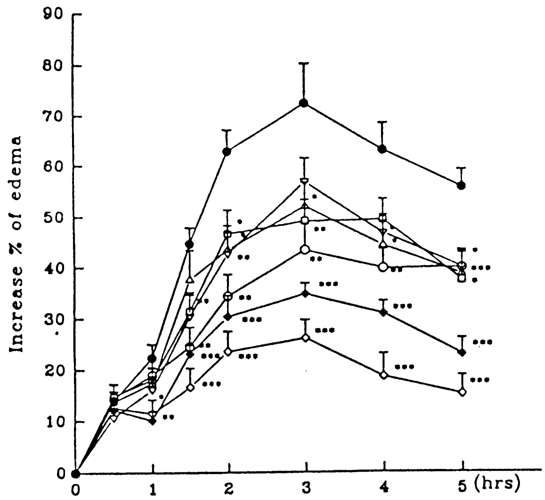


Fig 13 The effect of different extracted layers from rhizoma of *Balanophora spicata* and lupeol acetate effect on rat's hind paw edema induced by λ—carrageenin
● Control ○ Indomethacin 4mg/kg ▽ Water layer 100mg/kg
□ Butanol layer 100mg/kg △ Ethyl acetate layer 100mg/kg
◆ Hexane layer 100mg/kg ◇ Lupeol acetate 100mg/kg
Data are shown as mean ± S.E. (n=8)
* P<0.05 ** P<0.0, *** P<0.005 (compared with control)

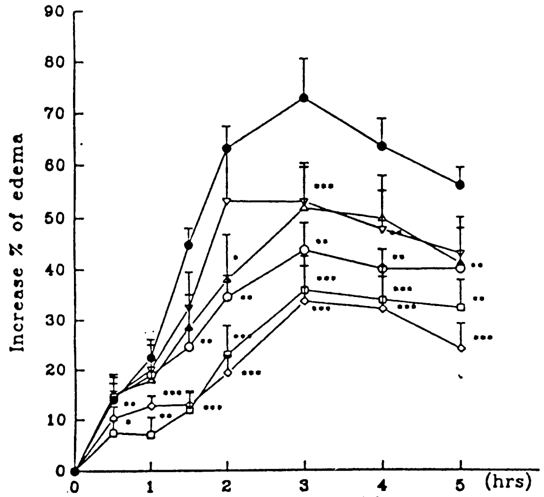


Fig 14 The effects of different extracted layers from spike (BSS) and lupeol acetate on rat's hind paw edema induced by carrageenin
● Control ○ Indomethacin 4mg/kg ▽ Water layer 100 mg/kg
□ Butanol layer 100mg/kg △ Ethyl acetate layer 100mg/kg
◇ Hexane layer 100mg/kg
Data are shown as mean ± S.E.(n=8)
* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001 (compared with control)

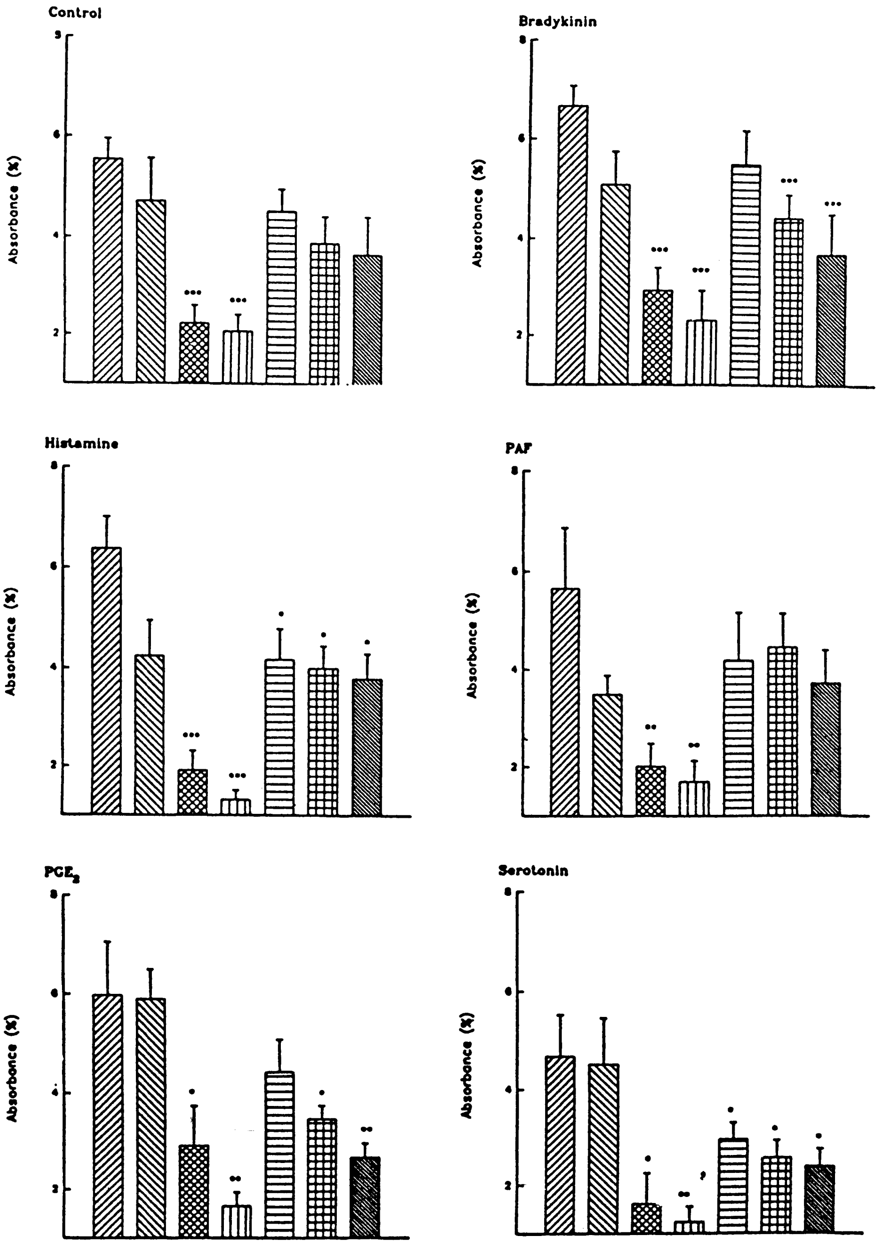


Fig. 15 The effects of crude extracts of *Balanophora spicata* in skin permeability caused by bradykinin, histamine, platelet-activating factor (PAF), PGE_2 and serotonin.

Saline BSS 50mg/kg BSS 100mg/kg
BSS 250mg/kg BSR 50mg/kg
BSR 100mg/kg BSR 250mg/kg
Data are shown as mean ± S.E. (n=8)
* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001 (compared with control)

The Pharmacological Studies of Anti-inflammation and Analgesia of *Balanophora spicata*

Huei-Yann Tsai, Chien Ching, Yuh-Fung Chen, Wen-Tsong Hsieh, Tian-Shan Wu and Chieh-Fu Chen***

Department of Pharmacology and Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical College, Taichung, Taiwan

*Department of Chemistry, National Cheng Kung University, Tainan,Taiwan

**National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, Taiwan

Balanophora spicata HAYATA.(abbreviation as BS) is a parastic plant of Balanophoracèae. It has been used as a folk medicine in Taiwan to increase strength, sobering up from drunkness, reducing fever and as an antidote. In this study, the anti-inflammatory and analgesic effects of spikes (BSS) and rhizoma (BSR) of BS were studied. The following results were obtained. The crude extracts of BSS and BSR inhibited the acetic acid-induced writhing response and inhibited the early and late phases of pain response induced by formalin. The analgesic effect of BS on the late phase is more potent than on the early phase. The similar effects in different extracted layers were obtained .

Several components extracted from hexane layer of BSR were BSRH-1, β-amyrin, β-amyrin palmitate, lupeol palmitate, lupeol stearate and lupeol acetate. Among them, lupeol acetate was the most abundant. Lupeol acetate inhibited the late phase of pain response induced by formalin. It also inhibited the acetic acid-induced writhing response in mice.

BSS and BSR inhibited the increase in vascular permeability which evoked by bradykinin, PGE_2, histamine and serotonin. Furthermore, BSS, BSR, different layers and lupeol acetate all inhibited the early and late phases of edema induced by λ-carrageenin.

From above results, it is suggested that BS has anti-inflammatory and analgesic effects. Its mechanism may be related to the inhibition of inflammatory substances both in central and peripheral nervous systems.

Key words: *Balanophora spicata,* folk medicine , anti-inflammatory and analgesic effects